


(19)  **Europäisches Patentamt**
European Patent Office
Office européen des brevets



(11) **EP 0 595 873 B1**

(12) **EUROPEAN PATENT SPECIFICATION**

- (45) Date of publication and mention of the grant of the patent:
05.04.2000 Bulletin 2000/14
- (21) Application number: 92915347.6
- (22) Date of filing: 30.06.1992
- (51) Int. Cl.⁷: **C12N 15/55**, **C12N 15/85**,
C12N 5/10, **A61K 48/00**,
C12Q 1/68
- (86) International application number:
PCT/US92/05385
- (87) International publication number:
WO 93/01281 (21.01.1993 Gazette 1993/03)

(54) **CYTOSINE DEAMINASE NEGATIVE SELECTION SYSTEM FOR GENE TRANSFER TECHNIQUES AND THERAPIES**
CYTOSINDEAMINASE NEGATIVES SELEKTIONSSYSTEM ZUR GENÜBERTRAGUNG UND THERAPIEN
SYSTEME DE SELECTION NEGATIVE DE CYTOSINE DESAMINASE POUR TECHNIQUES ET THERAPIES DE TRANSFERT DE GENE

- (84) Designated Contracting States:
AT BE CH DE DK ES FR GB GR IT LI LU MC NL SE
- (30) Priority: 03.07.1991 US 725076
- (43) Date of publication of application:
11.05.1994 Bulletin 1994/19
- (73) Proprietor:
THE GOVERNMENT OF THE UNITED STATES OF AMERICA as represented by the **SECRETARY OF THE DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES**
Bethesda, MD 20892-9902 (US)
- (72) Inventors:
• **MULLEN, Craig, A.**
Bethesda, MD 20814 (US)
• **BLAESE, R., Michael**
Rockville, MD 20854 (US)
- (74) Representative:
Thomson, Paul Anthony
Potts, Kerr & Co.
15, Hamilton Square
Birkenhead Merseyside L41 6BR (GB)
- (56) References cited:
EP-A- 0 402 108

- Archives of Microbiology, Volume 152, issued 1989, L. ANDERSEN et al., "Pyrimidine, Purine, and Nitrogen Control of Cytosine Deaminase Synthesis in Escherichia coli K12. Involvement of the glnLG and purG Genes in the Regulation of codA Expression", pages 115-118, see entire document.
- Cancer Research, Volume 45, issued April 1985, T. NISHIYAMA et al., "Antineoplastic Effects in Rats of 5-Fluorocytosine in Combination with Cytosine Deaminase Capsules", pages 1753-1761, see entire document.
- Science, Volume 238, issued 11 December 1987, M.J. BREITMAN et al., "Genetic Ablation: Targeted Expression of a Toxin Gene Causes Microphthalmia in Transgenic Mice", pages 1563-1565, see entire document.
- HUMAN GENE THERAPY, vol.1, 1990 pages 125-134 FREDERICK L. MOOLTEN ET AL. 'Lymphoma regression induced by ganciclovir in mice bearing a herpes thymidine kinase transgene'
- PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA., vol.89, no.1, 1 January 1992, WASHINGTON US pages 33 - 37 CRAIG A. MULLEN ET AL. 'Transfer of the bacterial gene for cytosine deaminase to mammalian cells confers lethal sensitivity to 5-fluorocytosine: A negative selection system'

Note: Within nine months from the publication of the mention of the grant of the European patent, any person may give notice to the European Patent Office of opposition to the European patent granted. Notice of opposition shall be filed in a written reasoned statement. It shall not be deemed to have been filed until the opposition fee has been paid. (Art. 99(1) European Patent Convention).

EP 0 595 873 B1

gene but not the quiescent bone marrow stem cells; and

(ii) administering of 5-fluorocytosine (5FC) to said cells such that cells that have genomically integrated said DNA construct are killed.

5 Patentansprüche

1. DNA-Konstrukt, das ein bakterielles Cytosin-Deaminase-Gen und einen eukaryotischen Expressionsvektor umfaßt, wobei das Cytosin-Deaminase-Gen am GTG-Translations-Initiations-Codon zu ATG modifiziert ist.

10 2. DNA-Konstrukt, das die ATCC-Hinterlegungsnummer 40999 aufweist.

3. Säugerwirtszelle, umfassend das DNA-Konstrukt nach Anspruch 1 oder 2.

4. Säugerwirtszelle nach Anspruch 3, die Cytosin-Deaminase-Protein exprimiert.

15 5. Cytosin-Deaminase-negatives Selektionssystem (CDNSS), das ein Sicherheitssystem in der Gentransfertherapie bereitstellt, umfassend die Schritte:

(i) Insertieren eines DNA-Konstrukts, umfassend ein Cytosin-Deaminase-Gen, wobei das Cytosin-Deaminase-Gen am GTG-Translations-Initiations-Codon zu ATG modifiziert ist, einen eukaryotischen Expressionsvektors und eine interessierende, exogene DNA in das Genom einer Wirtszelle, und

(ii) Behandeln der Wirtszelle mit 5-Fluorocytosin (5FC), wenn die Wirtszelle maligne wird, in pharmakologisch verträglichen Dosen, welche Zellen töten, die das DNA-Konstrukt im Genom integriert aufweisen.

25 6. CDNSS nach Anspruch 5, wobei die exogene DNA ein therapeutisches Gen ist.

7. CDNSS, das ein Sicherheitssystem in der Gentransfertherapie bereitstellt, umfassend die Schritte:

(i) Insertieren eines DNA-Konstrukts, umfassend ein Cytosin-Deaminase-Gen, wobei das Cytosin-Deaminase-Gen an dem GTG-Translations-Initiations-Codon zu ATG modifiziert ist, und einen eukaryotischen Expressionsvektor in das Genom einer Wirtszelle;

(ii) Behandeln der Wirtszelle mit Neomycin;

(iii) Insertieren eines zweiten, ein therapeutisches Gen umfassenden Konstrukts in die Wirtszelle, so daß sämtliche Zellen, die das therapeutische Gen eingebaut aufweisen, auch das Cytosin-Deaminase-Gen eingebaut aufweisen; und

(iv) Behandeln der Wirtszelle mit 5-Fluorocytosin (5FC), wenn die Wirtszelle maligne wird, in pharmakologisch verträglichen Dosen, welche Zellen töten, die das DNA-Konstrukt im Genom integriert aufweisen.

8. CDNSS, das ein Sicherheitssystem in der Gentransfertherapie bereitstellt, umfassend die Schritte:

(i) Insertieren eines DNA-Konstrukts, umfassend ein Cytosin-Deaminase-Gen, wobei das Cytosin-Deaminase-Gen an dem GTG-Translations-Initiations-Codon zu ATG modifiziert ist, ein therapeutisches Gen und einen eukaryotischen Expressionsvektor in das Genom einer Wirtszelle; und

(ii) Behandeln der Wirtszelle mit 5-Fluorocytosin (5FC), wenn die Wirtszelle maligne wird, in pharmakologisch verträglichen Dosen, welche Zellen töten, die das DNA-Konstrukt im Genom integriert aufweisen.

9. Verfahren zur Genregulierung in einer Wirtszelle, umfassend die Schritte:

(i) Insertieren eines DNA-Konstrukts, umfassend ein Cytosin-Deaminase-Gen, wobei das Cytosin-Deaminase-Gen an dem GTG-Translations-Initiations-Codon zu ATG modifiziert ist, einen eukaryotischen Expressionsvektor und ein interessierendes, therapeutisches Gen, in Wirtszellen, wobei man eine veränderte Wirtszelle erhält; und

(ii) Behandeln der veränderten Wirtszelle mit periodischen Dosen von 5-Fluorocytosin (5FC) in pharmakologischen Mengen, so daß die Anzahl der Wirtszellen verringert, jedoch nicht vollständig zerstört wird.

10. Verfahren zur Genproduktregulierung in einer Wirtszelle, umfassend die Schritte:

(i) Insertieren eines DNA-Konstrukts, umfassend ein Cytosin-Deaminase-Gen, wobei das Cytosin-Deaminase-

Gen an dem GTG-Translations-Initiations-Codon zu ATG modifiziert ist, einen eukaryotischen Expressionsvektor und ein interessierendes, therapeutisches Gen, in Wirtszellen, wobei man eine veränderte Wirtszelle erhält; und

(ii) Behandeln der veränderten Wirtszelle mit einer hohen Dosis 5-Fluorocytosin (5FC), so daß sämtliche veränderten Zellen zerstört werden.

11. Vakzin für Säuger gegen Tumore, umfassend ein Cytosin-Deaminase-Gen, wobei das Cytosin-Deaminase-Gen an dem GTG-Translations-Initiations-Codon zu ATG modifiziert ist, und einen eukaryotischen Expressionsvektor und Tumorextrakte oder Tumorzellen.

12. Verwendung des Vakzins nach Anspruch 11 und nachfolgende Verwendung von 5-Fluorocytosin (5FC) zur Herstellung von Medikamenten zur Verwendung bei der Behandlung von Tumoren durch Zerstören des Vakzins.

13. Vakzin für Säuger gegen ein mikrobiologisches Pathogen, umfassend einen lebenden, nicht abgeschwächten Virus, Bakterien oder Protozoen, Cytosin-Deaminase-Gen, wobei das Cytosin-Deaminase-Gen am GTG-Translations-Initiations-Codon zu ATG modifiziert ist, und einen Expressionsvektor in einer Menge, die ausreicht, um eine Immunisierung gegen den Virus, die Bakterien oder Protozoen zu induzieren.

14. Verwendung des Vakzins nach Anspruch 13 zur Herstellung eines Medikaments für die Immunisierung gegen den Virus, die Bakterien oder Protozoen.

15. Verwendung von allogenen oder autologen Knochenmark zur Herstellung des Medikaments zur Verwendung in Knochenmarkstransplantaten, wobei vor der Verwendung das Knochenmark einer Behandlung unterzogen wird, umfassend die Schritte:

- (i) Behandeln des Knochenmarks mit einem Cytosin-Deaminase-Konstrukt, wobei das Konstrukt am GTG-Translations-Initiations-Codon zu ATG modifiziert ist, und auf solche Weise in einen Vektor gepackt ist, daß das Konstrukt vorzugsweise Tumorzellen oder Lymphozyten, nicht jedoch Knochenmarkstammzellen infiziert; und
- (ii) Nachfolgendes Behandeln der Knochenmarkzellen mit 5-Fluorocytosin (5FC) in solchen Dosen, daß Tumorzellen oder Lymphozyten vollständig entfernt oder zerstört werden.

16. Verwendung nach Anspruch 15, wobei die 5-Fluorocytosin (5FC)-Behandlung auf die Knochenmarkstransplantation folgend gegeben wird.

17. Doppelt negativer Selektionsvektor, umfassend ein Cytosin-Deaminase-Gen, wobei das Cytosin-Deaminase-Gen am GTG-Translations-Initiations-Codon zu ATG modifiziert ist, das Herpes-Thymidinkinase-Gen und einen eukaryotischen Expressionsvektor.

18. Diagnoseverfahren zum Nachweis erfolgreicher homologer Rekombination, umfassend die Schritte:

- (i) Insertieren eines Cytosin-Deaminase-DNA-Konstrukts, wobei das Konstrukt am GTG-Translations-Initiations-Codon zu ATG modifiziert ist, in eine Zelllinie *in vitro*;
- (ii) Bilden eines Deletionsmutanten, der eine signifikante Homologie zu der DNA-Sequenz des Cytosin-Deaminase-DNA-Konstrukts beibehält, das Cytosin-Deaminase-Gen jedoch biologisch inaktiv macht; und
- (iii) Nachweis der erfolgreichen homologen Rekombination durch Messen des Verlustes der Empfindlichkeit gegen 5-Fluorocytosin (5FC).

19. *In vitro*-Verfahren zum selektiven Eliminieren von Zellen, umfassend die Schritte:

- (i) Insertieren eines Cytosin-Deaminase-DNA-Konstrukts, umfassend ein Cytosin-Deaminase-Gen, wobei das Cytosin-Deaminase-Gen am GTG-Translations-Initiations-Codon zu ATG modifiziert ist, und einen gewebespezifischen Promotor in die Zellen; und
- (ii) nachfolgende Behandlung der Zellen mit 5-Fluorocytosin (5FC), um die Zellen zu eliminieren, in denen der gewebespezifische Promotor aktiv ist.

20. *In vitro*-Verfahren zum Töten von Krebszellen in einer Zellpopulation, umfassend die Schritte:

- (i) Verabreichen eines DNA-Konstrukts an die Zellen, umfassend ein Cytosin-Deaminase-Gen, wobei das

Cytosin-Deaminase-Gen am GTG-Translations-Initiations-Codon zu ATG modifiziert ist, und einen Promotor mit einer Disposition, Krebszellen zu transduzieren; und

(ii) nachfolgende Behandlung der Zellen mit einer toxischen Dosis 5-Fluorocytosin (5FC), welche die Krebszellen, nicht jedoch andere Zellen zerstört.

21. *In vitro*-Verfahren zur Eliminierung HIV-infizierter Zellen in einer Zellpopulation, umfassend die Schritte:

- (i) Insertieren eines DNA-Konstrukts, umfassend ein Cytosin-Deaminase-Gen, wobei das Cytosin-Deaminase-Gen am GTG-Translations-Initiations-Codon zu ATG modifiziert ist, einen Promotor oder ein Enhancerelement aus dem HIV-Genom und einen eukaryotischen Expressionsvektor, in das Genom einer mit HIV infizierten, weißen Blutzelle; und
- (ii) Behandeln der Zellpopulation mit 5-Fluorocytosin (5FC), so daß Zellen, in die das DNA-Konstrukt eingebaut ist, getötet werden.

22. *In vitro*-Verfahren zur Behandlung von Tumoren in Knochenmarkstammzellen, umfassend die Schritte:

- (i) Insertieren eines DNA-Konstrukts, umfassend ein Cytosin-Deaminase-Gen, wobei das Cytosin-Deaminase-Gen am GTG-Translations-Initiations-Codon zu ATG modifiziert ist, und einen eukaryotischen Expressionsvektor in die Knochenmarkstammzellen durch retrovirale Transduktion, so daß lediglich die replizierenden Tumorzellen das Cytosin-Deaminase-Gen einbauen, nicht jedoch die ruhenden Knochenmarkstammzellen; und
- (ii) Verabreichen von 5-Fluorocytosin (5FC) an die Zellen, so daß Zellen, in die das DNA-Konstrukt genomisch integriert ist, getötet werden.

Revendications

1. Une construction d'ADN qui comprend un gène de cytosine désaminase bactérien et un vecteur d'expression eucaryote, ledit gène de cytosine désaminase étant modifié au niveau du codon d'initiation de traduction GTG en ATG.
2. La construction d'ADN dont le numéro d'enregistrement ATCC est 40999.
3. Une cellule hôte de mammifère comprenant ladite construction d'ADN selon la revendication 1 ou 2.
4. La cellule hôte de mammifère selon la revendication 3, qui exprime la protéine cytosine désaminase.
5. Un système de sélection négatif de cytosine désaminase (CDNSS) qui constitue un système de sécurité dans une thérapie de transfert génétique comprenant les étapes suivantes :
 - (i) l'insertion d'une construction d'ADN comprenant le gène de cytosine désaminase, ledit gène de cytosine désaminase étant modifié au niveau du codon d'initiation de traduction GTG en ATG, un vecteur d'expression eucaryote et un ADN exogène considéré dans le génome d'une cellule hôte ; et
 - (ii) le traitement de la cellule hôte par la 5-fluorocytosine (5FC) si ladite cellule hôte devient maligne en doses pharmaceutiquement acceptables qui tueront les cellules qui possèdent ladite construction d'ADN intégrée génomiquement.
6. Le CDNSS selon la revendication 5, dans lequel ledit ADN exogène est un gène thérapeutique.
7. Un CDNSS qui constitue un système de sécurité dans la thérapie de transfert génétique, comprenant les étapes suivantes :
 - (i) l'insertion d'une construction d'ADN comprenant un gène de cytosine désaminase, ledit gène de cytosine désaminase étant modifié au niveau du codon d'initiation de traduction GTG en ATG et un vecteur d'expression eucaryote dans le génome d'une cellule hôte ;
 - (ii) le traitement de ladite cellule hôte par la néomycine ;
 - (iii) l'insertion d'une seconde construction comprenant un gène thérapeutique dans ladite cellule hôte de façon que toutes les cellules qui ont intégré ledit gène thérapeutique ont également intégré ledit gène de cytosine désaminase ; et
 - (iv) le traitement de ladite cellule hôte par la 5-fluorocytosine (5FC) si ladite cellule hôte devient maligne à des